



PCT
WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 5 : C12N 5/08, A61K 37/02, 37/64 // (A61K 37/64, 37:02)		A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 93/03140 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 18. Februar 1993 (18.02.93)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP92/01173 (22) Internationales Anmeldedatum: 25. Mai 1992 (25.05.92) (30) Prioritätsdaten: P 41 25 933.5 5. August 1991 (05.08.91) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT. ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTEN E.V. [DE/DE]; Bunsenstraße 10, D-3400 Göttingen (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): ALTHAUS, Hans-Hinrich [DE/DE]; Bismarckstraße 120, D-3400 Göttingen (DE).		(74) Anwälte: WEICKMANN, H., Fincke usw. ; Kopernikusstraße 9, D-8000 München 80 (DE). (81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IT, LU, MC, NL, SE). Veröffentlicht Mit internationalem Recherchenbericht.	

(54) Title: IMPROVEMENT OF THE REGENERATION OF OLIGODENDROCYTES

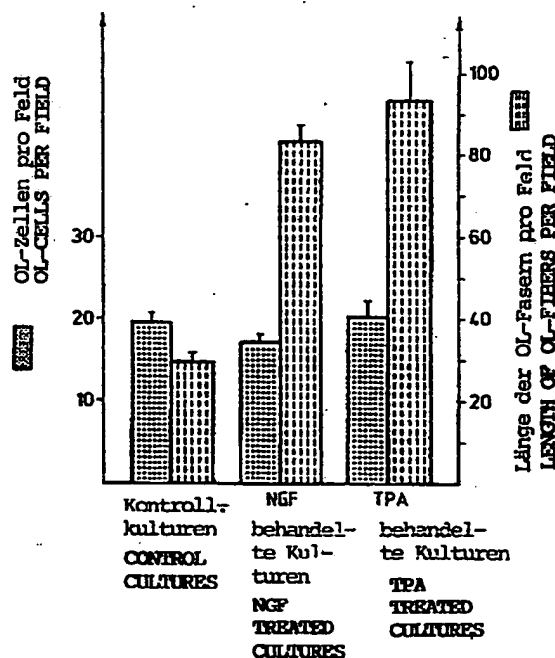
(54) Bezeichnung: VERBESSERUNG DER REGENERATION VON OLIGODENDROCYTEN

(57) Abstract

The invention concerns a method for improving the regeneration of oligodendrocytes, in particular human oligodendrocytes, by treating oligodendrocytes in a cell culture with nerve growth factor (NGF) or active fragments of NGF. Also disclosed is a composition for the treatment of illnesses in which demyelination of the nerve fibres occurs, the composition containing as an active substance NGF or an active fragment of NGF, optionally together with the customary carriers, fillers, dilution agents and other auxiliaries.

(57) Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Verbesserung der Regeneration von Oligodendrocyten, insbesondere von humanen Oligodendrocyten, bei dem man Oligodendrocyten in Zellkultur mit Nerve Growth Factor (NGF) oder aktiven Fragmenten von NGF behandelt. Weiterhin wird eine Zusammensetzung zur Behandlung von Krankheiten, bei denen eine Demyelinierung von Nervenfasern eintritt, offenbart, die als Wirkstoff NGF oder ein aktives Fragment davon, gegebenenfalls zusammen mit pharmazeutisch üblichen Träger-, Hilfs-, Füll- und Verdünnungsmitteln enthält.



LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Code, die zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	FI	Finnland	MR	Mauritanien
AU	Australien	FR	Frankreich	MW	Malawi
BB	Barbados	GA	Gabon	NL	Niederlande
BE	Belgien	GB	Vereinigtes Königreich	NO	Norwegen
BF	Burkina Faso	GN	Guinea	NZ	Neuseeland
BG	Bulgarien	GR	Griechenland	PL	Polen
BJ	Benin	HU	Ungarn	PT	Portugal
BR	Brasilien	IE	Irland	RO	Rumänien
CA	Kanada	IT	Italien	RU	Russische Föderation
CF	Zentrale Afrikanische Republik	JP	Japan	SD	Sudan
CG	Kongo	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CH	Schweiz	KR	Republik Korea	SK	Slowakische Republik
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SN	Senegal
CM	Kamerun	LK	Sri Lanka	SU	Sowjet Union
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TD	Tschad
CZ	Tschechische Republik	MC	Monaco	TG	Togo
DE	Deutschland	MG	Madagaskar	UA	Ukraine
DK	Dänemark	ML	Mali	US	Vereinigte Staaten von Amerika
ES	Spanien	MN	Mongolei		

- 1 -

Verbesserung der Regeneration von Oligodendrocyten

B e s c h r e i b u n g

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Verbesserung der Regeneration von Oligodendrocyten, insbesondere von humanen Oligodendrocyten. Weiterhin betrifft die Erfindung eine pharmazeutische Zusammensetzung zur Behandlung von Krankheiten, bei denen eine Demyelinierung von Nervenfasern eintritt, sowie ein Verfahren zu deren Herstellung.

Die Umhüllung von Nervenfasern im zentralen Nervensystem (ZNS) mit Myelin ist essentiell für das Funktionieren der Weitergabe von neuronalen Signalen. Die Myelinhülle wird von Oligodendrocyten (OL) gebildet, die ihre Fasern um das Axon einer Nervenzelle wickeln. Krankheiten, wie etwa Multiple Sklerose, bei denen die Myelinhülle des Axons geschädigt oder zerstört wird, führen auch zu Schädigungen der OL. Im Gegensatz zum peripheren Nervensystem (PNS) ist eine Remyelinierung von Nervenzellen im adulten ZNS funktional unwirksam. Daher ist die Identifizierung und Charakterisierung von Faktoren, die für die Regenerierung von OL verantwortlich sind, für das molekulare Verständnis von demyelinierenden Krankheiten und die Entwicklung von therapeutischen Mitteln sehr bedeutsam.

Reife Oligodendrocyten, die aus adultem Schweinehirn isoliert wurden, regenerieren bei Kultivierung in vitro und bilden innerhalb 14 Tagen ein Fasernetzwerk aus (Althaus et al. (1984), Naturwissenschaften 71, 309-315). Diese OL-Kulturen stellen daher ein hervorragendes Testsystem zur Ermittlung von Substanzen dar, welche die Regenerierung von OL stimulieren. Es wurde damit bereits gezeigt, daß Phorbolester wie etwa Phorbol-12-myristat-13-acetat (TPA) die Faserregeneration der OL erheblich steigern können. Phorbolester kommen im Milchsaft der Wolfsmilchgewächse oder in Crotonöl aus den Samen des indischen Croton tiglium vor. Sie sind jedoch als mögliche Arzneimittel zur Behandlung von demyelinierenden

Krankheiten völlig ungeeignet, da sie stark lokal reizend und kokarzinogen wirken.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es daher, eine Substanz zu finden, die eine Verbesserung der Regeneration von Oligodendrocyten bewirkt und zugleich keine Toxizität aufweist.

Die erfindungsgemäße Aufgabe wird durch ein Verfahren zur Verbesserung der Regeneration von Oligodendrocyten, insbesondere humanen Oligodendrocyten gelöst, welches dadurch gekennzeichnet ist, daß man Oligodendrocyten in Zellkultur mit Nerve Growth Factor (NGF) oder aktiven Fragmenten von NGF behandelt.

Die Bezeichnung "NGF" oder "aktives Fragment von NGF" im Sinne der vorliegenden Erfindung betrifft natürlichen NGF, insbesondere natürlichen humanen oder murinen NGF und alle Fragmente oder Derivate von NGF, die dessen biologische Aktivität aufweisen, d.h. eine Verbesserung der Faserregeneration von Oligodendrocyten in vitro oder/und die Proliferation von reifen Oligodendrocyten bewirken. Beispiele für NGF-Moleküle, die sich für das erfindungsgemäße Verfahren eignen, sind etwa NGF- β , NGF 2,5S oder NGF 7S aus der Submaxillaris-Drüse der Maus. Diese NGF-Moleküle sind beispielsweise von Sigma-St.Louis oder Boehringer Mannheim kommerziell erhältlich. Vorzugsweise führt man das erfindungsgemäße Verfahren mit einem humanen NGF, besonders bevorzugt mit humanem rekombinantem NGF- β durch. Die Herstellung eines aktiven NGF-Fragments durch tryptische Verdauung von NGF ist bei Mercanti et al. (Biochim.Biophys:Acta 496 (1977), 412-419) beschrieben. Dieses Fragment besteht aus zwei linearen Oligopeptiden, die durch eine Disulfidbrücke verknüpft sind, und enthält die Aminosäurereste 10 bis 25 und 75 bis 88 der Aminosäuresequenz von NGF (entsprechend der Nomenklatur von Angeletti und Bradshaw (1970), Proc.Natl.Acad.Sci. USA 68, 2417-2421).

Bei Behandlung von Oligodendrocyten in Zellkultur mit NGF (NGF 2,5S oder humaner rekombinanter NGF) wurde die Faserregeneration der OL ähnlich wie bei Behandlung mit Phorbolestern, aber mit einem etwas anderen zeitlichen Verlauf verbessert. So wurde bei Behandlung von OL mit Phorbol-ester ein Fasernetzwerk bereits nach 24 Stunden erzeugt, während dafür in Gegenwart von NGF 48 Stunden erforderlich waren. Die NGF-Wirkung wurde durch Anti-NGF-Antikörper inhibiert.

Steigende NGF-Wirkungskonzentrationen ergaben keine schnellere Regeneration der OL-Fasern, es wurde jedoch gefunden, daß das Ausmaß der Fasereelongation und -verzweigung konzentrationsabhängig war. Durch NGF konnte die Faserproduktion in allen Oligodendrocyten verbessert werden, welche mindestens für die Untersuchungsdauer (2 Wochen) überlebten.

Zusätzlich wurde festgestellt, daß NGF 2,5S die Proliferation einer Subklasse von kultivierten reifen OL induziert. Mit humanem rekombinantem NGF wurden ähnliche Resultate erhalten. Diese Wirkung war konzentrationsabhängig und trat erst auf, wenn die Zellen länger als 24 Stunden mit NGF behandelt wurden. Die Induzierung der Proliferation wurde durch Anti-NGF-Antikörper blockiert. Die höchste Rate der NGF-Proliferation wurde bei Behandlung der Zellen mit einer Kombination von Phorbol-ester und NGF gefunden.

Die Wirkung von NGF kann auch verbessert werden, wenn die Behandlung der Oligodendrocyten mit einer Kombination von NGF und einem oder mehreren Proteasehemmstoffen erfolgt. Ein Beispiel für einen geeigneten und bevorzugten Proteasehemmstoff ist Aprotinin, das beispielsweise unter dem Handelsnamen "Trasylol" von Bayer-Leverkusen vertrieben wird.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine pharmazeutische Zusammensetzung zur Behandlung von Krankheiten, bei denen eine Demyelinierung von Nervenfasern eintritt, und die als Wirkstoff NGF oder ein aktives Fragment davon, gegebenenfalls zusammen mit pharmazeutisch üblichen Träger-, Hilfs-, Füll- und Verdünnungsmitteln enthält. Vorzugsweise enthält die pharmazeutische Zusammensetzung humanen NGF, vorzugsweise humanen rekombinanten NGF- β . Weiterhin kann die Zusammensetzung einen oder mehrere pharmazeutisch verträgliche Proteasehemmstoffe, beispielsweise Aprotinin enthalten.

Die Erfindung betrifft ferner ein Verfahren zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur Behandlung von Krankheiten, bei denen eine Demyelinierung von Nervenfasern eintritt, die als Wirkstoff NGF oder ein aktives Fragment davon, gegebenenfalls zusammen mit pharmazeutisch üblichen Träger-, Hilfs-, Füll- und Verdünnungsmitteln enthält, wobei man vorzugsweise als Wirkstoff humanen NGF, besonders bevorzugt humanen rekombinanten NGF- β verwendet.

Für die Herstellung von pharmazeutischen Präparaten können die erfindungsgemäßen Zusammensetzungen mit therapeutisch akzeptablen Trägersubstanzen verarbeitet werden. Geeignete Träger für die Herstellung von derartigen Lösungen sind Wasser, Polyole, Saccharose, Invertzucker und Glucose. Geeignete Träger für Injektionslösungen sind Wasser, Alkohole, Polyole, Glycerin und pflanzliche Öle.

Die pharmazeutischen Präparate können ferner Konservierungsmittel, Lösungsmittel, Stabilisierungsmittel, Netzmittel, Emulgiermittel, Salze zur Veränderung des osmotischen Drucks, Puffer sowie gegebenenfalls andere therapeutische Wirkstoffe enthalten.

Krankheiten, bei denen eine Demyelinierung von Nervenfasern eintritt und die mit Hilfe der erfindungsgemäßen pharmazeuti-

schen Zusammensetzung behandelbar sind, können etwa durch Entzündungen, autoimmunologische Prozesse, Enzyme oder Toxine hervorgerufen werden. Beispiele für solche Krankheiten sind etwa Multiple Sklerose, Slow Virus Enzephalie, verschiedene Formen der Myelitis oder Schwermetallvergiftungen.

Die erfindungsgemäße Zusammensetzung wird vorzugsweise systemisch appliziert. Die Applikation kann durch die dem Fachmann geläufigen Methoden erfolgen, beispielsweise intrazisternal C, intravenös oder peripher. Zur intrazisternalen oder intravenösen Applikation kann NGF, beispielsweise in physiologischer Kochsalzlösung, suspendiert sein.

Die Zugabe von Proteasehemmstoffen, z.B. Aprotinin, ist bei täglicher Verabreichung von NGF nicht zwingend erforderlich, bietet aber einen Schutz gegenüber Proteasen, die NGF unwirksam machen könnten. Die bevorzugte Untergrenze der täglich verabreichten NGF-Dosis liegt bei einer Konzentration von 10 ng NGF/ml Blut, während die bevorzugte Obergrenze bei 300 ng NGF/ml liegt. Die Verabreichung von NGF erfolgt vorzugsweise über einen längeren Zeitraum, d.h. mindestens 48 Stunden.

Die vorliegende Erfindung soll weiterhin durch die folgenden Beispiele in Verbindung mit den Figuren 1 und 2 verdeutlicht werden. Es zeigen:

Figur 1 das Faserwachstum von Oligodendrocyten in Gegenwart von NGF und

Figur 2 den Einbau von [^3H] Thymidin in kultivierte Oligodendrocyten in Gegenwart verschiedener Wachstumsfaktoren.

Beispiel 1

Kultivierung von Oligodendrocyten

Oligodendrocyten wurden aus dem Corpus callosum von ca. 1-jährigen Schweinen über einen Dichtegradienten gewonnen und anschließend in Kultur gebracht (Gebicke-Härter et al. (1984), J.Neurochem. 42, 357-368). Die Zellen wurden auf Poly-D-lysin beschichtete Petrischalen ausgesät und in einem Medium bestehend aus MEM/HAM's F-10 (1:1 v/v), 10 % fötalem Kälberserum sowie Transferrin (10 µg/ml), Insulin 5 µg/ml und Mezlocillin (40 µg/ml) bei üblichen Kulturbedingungen (5 % CO₂, 37°C) kultiviert. Aufgrund ihrer Oberflächencharakteristika handelte es sich bei den Zellen um reife Oligodendrocyten, sie waren immunocytochemisch GC⁺, WP⁺ (Marker für reife OL), A₂B₅⁻ (Marker für OL-Vorläuferzellen) und OX42⁻ (Marker für Mikrogliazellen). Als Marker wurden monoklonale Antikörper und polyklonale Antiseren verwendet.

Beispiel 2

Wachstum von Oligodendrocytenfasern in Gegenwart von NGF

Zu Oligodendrocyten aus Beispiel 1 wurden nach 6 Tagen Kultivierung in vitro NGF (humaner rekombinanter NGF-β, 100 ng/ml) und Trasylol (1000 U/ml, Bayer Leverkusen) zum Kulturmedium gegeben, das täglich erneuert wurde. Die durch Trasylol verursachte Proteasehemmung sorgte für einen konstanteren NGF-Spiegel während der Kultivierung. Nach zweitägiger Behandlung wurden die Zellen fixiert und elektronenmikroskopisch untersucht. Figur 1 zeigt einen Vergleich der Faserlänge zwischen unbehandelten Kontrollzellen, NGF-behandelten Zellen und Phorbol ester (TPA)-behandelten Zellen. Die Faserlänge, die anhand vergrößerter Phasenkontrastphotographien ermittelt wurde, zeigte in Kontrollkulturen und NGF-behandelten Kulturen einen statistisch signifikanten Unterschied (t-Test, Faserlänge/Zellzahl, p < 0,001), wie es auch bei TPA-behandelten Kulturen der Fall war.

Beispiel 3

Proliferation von reifen Oligodendrocyten in Gegenwart von NGF

Oligodendrocyten wurden auf Poly-D-Lysin-beschichteten Multiwell-Kulturplatten (160.000 Zellen/Well) nach 6 Tagen in vitro mit verschiedenen Wachstumsfaktoren (plus Trasylol) mit den in Tabelle 1 gezeigten Konzentrationen behandelt, wobei das Kulturmedium täglich erneuert wurde. Die Proliferation der Oligodendrocyten wurde über den Einbau von [³H]-Thymidin in 24-stündigen Intervallen gemessen. Jede Behandlung wurde doppelt durchgeführt und mindestens zweimal wiederholt. Die Standardabweichung zwischen den einzelnen Proben war im Bereich von 20 bis 25 %.

Tabelle 1

Getestete Substanz	OL-Faserbildung	Herkunft der Substanz
1. NGF (2,5 S) (10-300ng/ml)	+	Maus-Submaxillaris- Drüse
2. NGF (2,5 S) (100 ng/ml) + anti-NGF/1:200)	=	Kaninchen (polyklonal)
3. NGF- β (10-100ng/ml)	+	human, rekombinant
4. Trasylol (1000U/ml)	=	Handelsname von Apro- tinin, Bayer-Lever- kusen
5. Interleukin-2 (100-1000U/ml)	=	human, rekombinant

- 8 -

- | | | |
|--|---|------------------------------|
| 6. EGF (1-100ng/ml)
(Epidermal Growth Factor) | = | Maus-Submaxillaris-
Drüse |
| 7. FGF (a/b)
(1-200ng/ml)
(Fibroblast Growth Factor) | = | Rind |
| 8. IGF I/II
(10-100ng/ml)
(Insulinlike Growth
Factor) | = | human, rekombinant |
| 9. PDGF (2-10ng/ml)
(Platelet Derived
Growth Factor) | = | humane Plättchenzellen |

Die verschiedenen Wachstumsfaktoren wurden von Sigma-St. Louis (1,2,5,7,9) und Boehringer Mannheim (1-3, 8) bezogen. Das täglich erneuerte Kulturmedium wurde mit 10 % fötalem Kälberserum versetzt und enthielt die Wachstumsfaktoren in den jeweils oben angegebenen Endkonzentrationen + 1000 U/ml Trasylol. Bei IGF I und II wurde die gewöhnliche Insulinkonzentration von 5 µg auf 0,5 µg/ml verringert. Die Faserbildung wurde wie folgt klassifiziert:

- = einige kurze (mit einer Länge von 3-4x des Körperdurchmessers) Fasern und sehr wenige Verzweigungen vorhanden, entspricht den Kontrollkulturen;
- + Fasernetzwerk mit verstärktem Stoffwechsel.

Figur 2 zeigt den Einbau von [³H]-Thymidin in Gegenwart verschiedener Wachstumsfaktoren. Dabei ist ersichtlich, daß neben Phorbol ester (TPA) nur NGF eine Wirkung auf die Proliferation von OL zeigt. In Gegenwart von Anti-NGF-Antikörper wird die durch NGF erzeugte Zellproliferation vollständig inhibiert.

P a t e n t a n s p r ü c h e

1. Verfahren zur Verbesserung der Regeneration von Oligodendrocyten, insbesondere von humanen Oligodendrocyten, dadurch gekennzeichnet, daß man Oligodendrocyten in Zellkultur mit Nerve Growth Factor (NGF) oder aktiven Fragmenten von NGF behandelt.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man die Behandlung mit humanem rekombinantem NGF- β durchführt.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß man weiterhin einen oder mehrere Proteasehemmstoffe zusetzt.
4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß man Aprotinin als Proteasehemmstoff verwendet.
5. Pharmazeutische Zusammensetzung zur Behandlung von Krankheiten, bei denen eine Demyelinierung von Nervenfasern eintritt, dadurch gekennzeichnet, daß sie als Wirkstoff NGF oder ein aktives Fragment davon, gegebenenfalls zusammen mit pharmazeutisch üblichen Träger-, Hilfs-, Füll- und Verdünnungsmitteln enthält.
6. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß sie als Wirkstoff humanes rekombinantes NGF- β enthält.

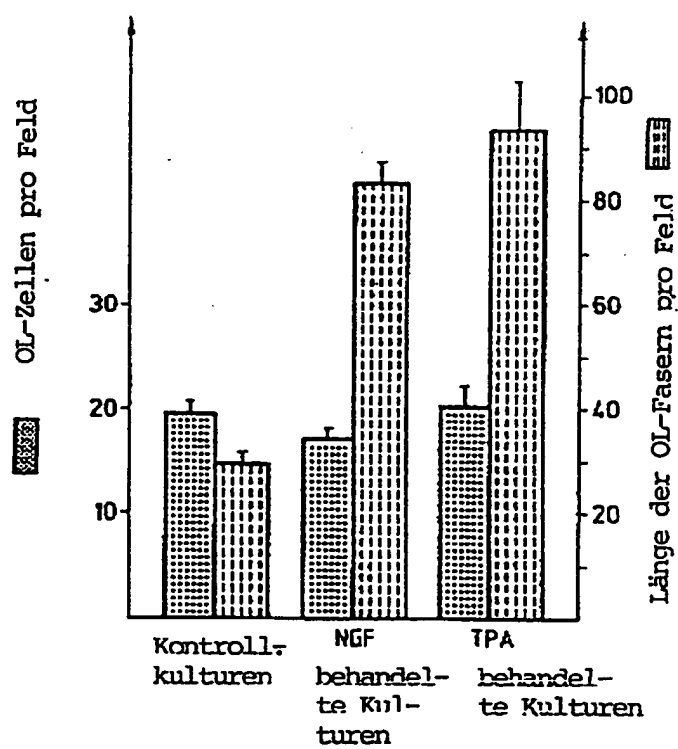
7. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 5 oder 6,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
daß sie weiterhin einen oder mehrere Proteasehemmstoffe
enthält.
8. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 7,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
daß sie als Proteasehemmstoff Aprotinin enthält.
9. Verfahren zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusam-
mensetzung zur Behandlung von Krankheiten, bei denen
eine Demyelinierung von Nervenfasern eintritt, die als
Wirkstoff NGF oder ein aktives Fragment davon, gegeben-
nenfalls zusammen mit pharmazeutisch üblichen Träger-,
Hilfs-, Füll- und Verdünnungsmitteln enthält.
10. Verfahren nach Anspruch 9,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
daß man als Wirkstoff humanes rekombinantes NGF verwen-
det.
11. Verfahren nach Anspruch 9 oder 10,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
daß die Zusammensetzung weiterhin einen oder mehrere
Proteasehemmstoffe enthält.
12. Verfahren nach Anspruch 11,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
daß die Zusammensetzung als Proteasehemmstoff Aprotinin
enthält.
13. Verfahren zur Bekämpfung von Krankheiten, bei denen eine
Demyelinierung von Nervenfasern eintritt,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
daß man eine Zusammensetzung verabreicht, die als Wirk-
stoff NGF oder ein aktives Fragment davon, gegebenen-

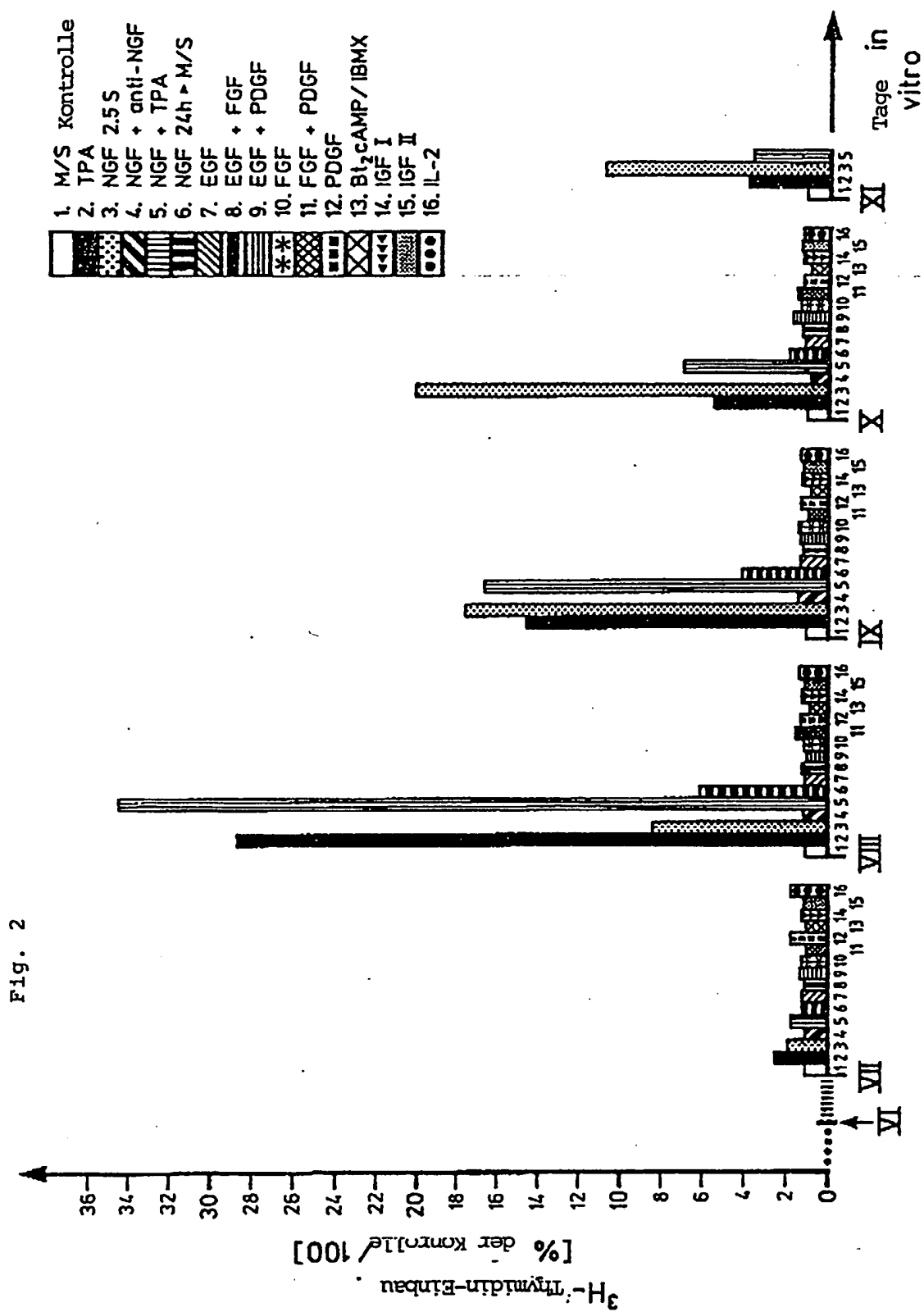
falls zusammen mit pharmazeutisch üblichen Träger-,
Hilfs-, Füll- und Verdünnungsmitteln enthält.

14. Verfahren nach Anspruch 13,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
daß man die Zusammensetzung intravenös verabreicht.

1/2

Fig. 1





INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP 92/01173

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.⁵ C12N5/08; A61K37/02; A61K37/64; //(A61K37/64 37:02)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.⁵ C12N; A61K; C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	J. BIOL. CHEM. vol. 263, No. 9, 25 March 1988, AM. SOC. MOL. BIOL., INC., US pages 4460 - 4466; F.L. HALL ET AL.: 'Suppression of nerve growth factor-directed neurite outgrowth in PC12 cells by sphingosine, an inhibitor of protein kinase C' see page 4460, left-hand column, line 1 - line 46	1,2
Y	PROC. NATL. ACAD. SCI. vol. 83, April 1986, NATL. ACAD. SCI., WASHINGTON, DC, US; pages 2353 - 2357; T. HAMA ET AL.: 'Protein kinase C as a component of a nerve growth factor-sensitive phosphorylation system in PC12 cells' see page 2355, right-hand column, line 18 - page 2356, right-hand column, line 21	1,2
	-/-	



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

21 September 1992 (21.09.92)

Date of mailing of the international search report

12 October 1992 (12.10.92)

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office

Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP 92/01173

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	NATO ASI SERIES, VOL. H43 1990, SPRINGER VERLAG BERLIN, BRD; pages 247 - 253; H.H. ALTHAUS ET AL.: 'Protein kinases A and C are involved in oligodendroglial process formation' In G. Jeserich et al. (Eds.), Cellular and Molecular Biology of Myelination see page 247, line 1 - line 11 see page 252, line 1 - line 25	1-2
A	NATURE vol. 317, No. 6038, October 1985, MACMILLAN JOURNALS LTD., LONDON, UK; pages 632 - 634; L.E. LILLIEN AND P. CLAUDE: 'Nerve growth factor is a mitogen for cultured chromaffin cells'	
P,X	NEUROSCI. LETT. vol. 135, No. 2, February 1992, ELSEVIER, SHANNON, IRELAND; pages 219 - 223; H.H. ALTHAUS ET AL.: 'Nerve growth factor induces proliferation and enhances fiber regeneration in oligodendrocytes isolated from adult pig brain' see page 219, left-hand column, line 1 - page 222, left-hand column, line 42	1,2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP 92/01173

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
Remark: Although Claims 13,14 relate to a method for treatment of the human or animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

I. KLASSEKATION DES ANMELDUNGSGEGENSTANDS (bei mehreren Klassifikationssymbolen sind alle anzugeben)⁶

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC

Int.Kl. 5 C12N5/08; A61K37/02; A61K37/64; //(A61K37/64
37:02)**II. RECHERCHIERTE SACHGEBIETE**Recherchierter Mindestprüfstoff⁷

Klassifikationssystem Klassifikationssymbole

Int.Kl. 5 C12N ; A61K ; C07K

Recherchierte nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Sachgebiete fallen⁸**III. EINSCHLAGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN⁹**

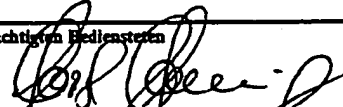
Art. ⁹	Kennzeichnung der Veröffentlichung ¹¹ , soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile ¹²	Betr. Anspruch Nr. ¹³
Y	J. BIOL. CHEM. Bd. 263, Nr. 9, 25. März 1988, AM. SOC. MOL. BIOL. , INC., US Seiten 4460 - 4466; F.L.HALL ET AL.: 'Suppression of nerve growth factor-directed neurite outgrowth in PC12 cells by sphingosine, an inhibitor of protein kinase C' siehe Seite 4460, linke Spalte, Zeile 1 - Zeile 46 --- -/-	1,2

⁹ Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen¹⁰:

- "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

- "T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis der der Erfindung zugrundeliegenden Prinzipien oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
- "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
- "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
- "&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

IV. BESCHEINIGUNG

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absenddatum des internationalen Recherchenberichts
21. SEPTEMBER 1992	12. 10. 92
Internationale Recherchenbehörde EUROPAISCHES PATENTAMT	Unterschrift des bevollmächtigten Bediensteten HORNIG H. 

III. EINSCHLAGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN (Fortsetzung von Blatt 2)		
Art °	Kennzeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	<p>PROC. NATL. ACAD. SCI. Bd. 83, April 1986, NATL. ACAD. SCI., WASHINGTON, DC, US; Seiten 2353 - 2357; T. HAMA ET AL.: 'Protein kinase C as a component of a nerve growth factor-sensitive phosphorylation system in PC12 cells' siehe Seite 2355, rechte Spalte, Zeile 18 - Seite 2356, rechte Spalte, Zeile 21</p>	1,2
Y	<p>NATO ASI SERIES, VOL. H43 1990, SPRINGER VERLAG BERLIN, BRD; Seiten 247 - 253; H.H. ALTHAUS ET AL.: 'Protein kinases A and C are involved in oligodendroglial process formation' In G. Jeserich et al.(Eds.), Cellular and Molecular Biology of Myelination siehe Seite 247, Zeile 1 - Zeile 11 siehe Seite 252, Zeile 1 - Zeile 25</p>	1-2
A	<p>NATURE Bd. 317, Nr. 6038, Oktober 1985, MACMILLAN JOURNALS LTD., LONDON, UK; Seiten 632 - 634; L.E. LILLIEN AND P.CLAUDE: 'Nerve growth factor is a mitogen for cultured chromaffin cells'</p>	
P,X	<p>NEUROSCI. LETT. Bd. 135, Nr. 2, Februar 1992, ELSEVIER, SHANNON, IRELAND; Seiten 219 - 223; H.H. ALTHAUS ET AL.: 'Nerve growth factor induces proliferation and enhances fiber regeneration in oligodendrocytes isolated from adult pig brain' siehe Seite 219, linke Spalte, Zeile 1 - Seite 222, linke Spalte, Zeile 42</p>	1,2

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 1 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☒ Ansprüche Nr.
weil Sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
Bemerkung: Obwohl die Ansprüche 13,14 sich auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen Körpers beziehen, wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.
2. ☐ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
3. ☐ Ansprüche Nr.
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche der internationalen Anmeldung.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchengebühr gerechtfertigt hätte, hat die Internationale Recherchenbehörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche der internationalen Anmeldung, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.

☐ Die Zahlung zusätzlicher Gebühren erfolgte ohne Widerspruch.